

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.  
13. Jg. 1975, S. 179–181

## Der Einfluß von Pyridoxal-5'-phosphat auf das Temperaturverhalten der Aspartataminotransferase-Isoenzyme

Von K. Jung, Brigitte Lüdtke und E. Egger

Aus der Abteilung Klinische Biochemie des Bereichs Medizin (Charité) und dem Lehrstuhl Pathologische Biochemie (Leiter: Prof. Dr. E. Egger) der Humboldt-Universität Berlin

(Eingegangen am 2. Dezember 1974)

Der Einfluß von Pyridoxal-5'-phosphat auf das Temperaturverhalten der Aspartataminotransferase wurde untersucht. In-vitro-Zusatz von Pyridoxal-5'-phosphat führte zu einer Steigerung der Aspartataminotransferase-Aktivität und zu einem veränderten Temperaturverhalten. Die Frage der Meßtemperatur bei Enzymaktivitätsbestimmungen muß also gegebenenfalls auch im Zusammenhang mit dem Coenzym betrachtet werden.

### *The influence of pyridoxal 5'-phosphate on the temperature relationships of aspartate aminotransferase isoenzymes*

The relationship between temperature and the behaviour of aspartate aminotransferase was investigated in the presence of pyridoxal 5'-phosphate. The addition in vitro of pyridoxal 5'-phosphate caused an increase in the activity and altered the thermal behaviour of aspartate aminotransferase. In choosing the temperature for the determination of enzymic activity, the concentration of the coenzyme must therefore also be considered.

Das Problem der Meßtemperatur bei Enzymaktivitätsbestimmungen im Serum ist zur Zeit ein aktuelles Forschungsgebiet der klinischen Chemie. Die strittigen Punkte, insbesondere die Denaturierung und Inaktivierung von Enzymen des Serums bei Meßtemperaturen über 30 °C, sind nur durch entsprechende Versuche zu klären (1, 2). Kürzlich wurde über den Einfluß der Meßtemperatur auf die Aspartataminotransferase (EC 2.6.1.1) berichtet (3). Durch den Zusatz von isolierten Isoenzymen aus Humanleber zu inaktiviertem Serum gelang es uns, den Einfluß der Meßtemperatur auf die beiden Aspartataminotransferase-Isoenzyme näher zu charakterisieren (4).

Über den Einfluß von Pyridoxal-5'-phosphat auf das Temperaturverhalten der Aspartataminotransferase soll hier kurz berichtet werden.

### Methodik

Die Enzymaktivitätsbestimmungen erfolgten am LKB Reaction Rate Analyzer 8600 bei 340 nm und 37 °C und am Eppendorf-Photometer bei 334 nm in kontinuierlicher Messung mit Schreiber bei 25 °C und den in den Abbildungen ausgewiesenen Temperaturen. Die Temperatur im Bestimmungsansatz wurde wie in einer vorhergehenden Mitteilung (5) näher beschrieben konstant gehalten. Die Abweichungen von der Solltemperatur bzw. die Temperaturschwankungen während der Messungen betrugen nicht mehr als  $\pm 0,07$  °C.

Die Endkonzentrationen im Testansatz von 1,5 ml Endvolumen betrugen, wenn nicht anders erwähnt, 200 mmol/l L-Aspartat 80 mmol/l Phosphatpuffer, pH 7,4, 0,18 mmol/l NADH, 12 mmol/l 2-Oxoglutarat (6), 1000 U/l Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37) und bei Zusatz von Pyridoxal-5'-phosphat 200  $\mu$ mol/l (7). Als Hilfsenzym wurde Malatdehydrogenase in Glycerin verwendet, um eine Verfälschung des Ergebnisses

durch Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.3) bei Einsatz von  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Suspension zu vermeiden und den unterschiedlichen Hemmeffekt von Sulfationen auf die Isoenzyme (8) auszuschließen. Das Verhältnis von Probenvolumen zum Gesamtvolumen betrug 1:7,5. Gestartet wurde mit 2-Oxoglutarat nach Vorinkubation von 10–15 min.

Die ermittelten Enzymaktivitäten entsprechen den Umsätzen in der ersten Minute des Linearteils unter Berücksichtigung des unspezifischen Vorlaufs und der bei Zusatz von Pyridoxal-5'-phosphat erfolgten Stimulierung der Apo-Aspartataminotransferase, die in der Malatdehydrogenaselösung enthalten ist. Die in den Arrhenius-Diagrammen angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Die Standardabweichung  $s$  wurde dabei nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{\sum R^2}{2m}}$$

( $R$  = Differenz der Doppelbestimmungen,  $m$  = Anzahl der Doppelbestimmungen) errechnet. Die Präzision in der Serie (10fach-Bestimmung) war für ein gepooltes Serum von 9,6 U/l bzw. 21,0 U/l bei 25 °C bzw. 37 °C durch die Standardabweichung  $s = 0,5$  U/l bzw. 0,4 U/l charakterisiert.

Als Untersuchungsmaterial verwendeten wir Seren von unausgewählten Patienten bzw. mit humanen Aspartataminotransferase-Isoenzymen angereicherte Albuminlösung (40 g/l). Die Isoenzyme wurden nach Schmidt et al. (9) und Jenkins et al. (10) aus Humanleber isoliert, mit der Agargelelektrophorese auf ihre Reinheit überprüft und in 200 mmol/l Phosphatpuffer, pH 6 bei +4 °C aufbewahrt. Die verwendeten Biochemikalien waren Produkte der Boehringer Mannheim GmbH. Pyridoxal-5'-phosphat stammte von Calbiochem, Los Angeles und Humanserumalbumin vom Forschungsinstitut für Impfstoffe Dessau.

### Ergebnisse und Diskussion

Pyridoxal-5'-phosphat ist das Coenzym der Aspartataminotransferase (11). Der in vitro-Zusatz von Pyridoxal-5'-phosphat führt zu einer Steigerung der Aspar-

tataminotransferase-Aktivität und zu einer höheren thermischen Stabilität (7, 12). Die Abhängigkeit dieser Stimulierung von der Meßtemperatur ist bisher unseres Wissens nicht untersucht worden. Wir bestimmten die Aspartataminotransferase-Aktivität mit und ohne Pyridoxal-5'-phosphat-Zusatz in 31 Seren von Patienten bei 25 °C und 37 °C. Die prozentuale Stimulierung durch den Zusatz von 200 µmol/l Pyridoxal-5'-phosphat im Testsystem betrug für die 31 Seren bei 25 °C  $14,3\% \pm 2,2$ , bei 37 °C  $21,6\% \pm 2,6$  entsprechend dem Mittelwert  $\pm s_x$ .

Die statistische Überprüfung der Stimulierungsraten bei 25 °C und 37 °C mit Hilfe des Paarvergleichs zeigte bei einem  $t$  von 4,37 mit hoher statistischer Signifikanz ( $p < 0,001$ ) einen Unterschied. Dieser ist nicht auf eine erhöhte thermische Stabilität der Aspartataminotransferase bei 37 °C im Testansatz mit Pyridoxal-5'-phosphat zurückzuführen. Dies ergaben Untersuchungen der thermischen Stabilität der mitochondrialen und cytoplasmatischen (m- und c-) Aspartataminotransferase bei bis auf 60 min verlängerter Vorinkubationszeit bei 37 °C. Die Aktivitäten der beiden Isoenzyme blieben dabei innerhalb der Vorkubationszeit von 45 min unverändert. Erst nach 60 min sank die Aktivität der m-Aspartataminotransferase um 5% gegenüber der nach einer für die Erreichung der Temperaturkonstanz notwendigen Vorinkubation von 5 min. Die Aktivität der c-Aspartataminotransferase blieb konstant.

Um die Ursache dieser unterschiedlichen Stimulierung bei 25 °C und 37 °C zu klären, wurde das Temperaturverhalten der Aspartataminotransferase von gepoolten Seren und der Aspartataminotransferase-Isoenzyme im Temperaturbereich von 15 °C bis 44 °C mit und ohne Zusatz von Pyridoxal-5'-phosphat untersucht. Die aus Humanleber isolierten Isoenzyme wurden einer Albuminlösung (40 g/l) zugesetzt, um dem Serum adäquate Verhältnisse zu schaffen und da Pyridoxal-5'-phosphat auch an Albumin gebunden wird (13).

Die beobachtete Abhängigkeit der Stimulierungsrate von der Meßtemperatur erklärt sich, wie aus den Arrhenius-Auftragungen ersichtlich wird (Abb. 1, 2, 3), aus dem Temperaturverhalten der Aspartataminotransferase. Mit steigender Meßtemperatur erhöht sich das Verhältnis der nach Zusatz von Pyridoxal-5'-phosphat bestimmten Aktivität zu der ohne Pyridoxal-5'-phosphat ermittelten Aktivität.

Wie Szasz (3) konnten wir in der Arrhenius-Auftragung für die Aspartataminotransferase-Aktivität von Serum eine Abweichung von der Linearität bei höheren Meßtemperaturen feststellen (Abb. 1). Sie liegt zwischen 27 °C und 30 °C. Dies gilt gleichfalls für beide Isoenzyme (Abb. 2, 3). Durch Zusatz von Pyridoxal-5'-phosphat ließ sich jedoch in allen Fällen diese Diskontinuität beseitigen.

Die Ursachen von Diskontinuitäten im Arrhenius-Diagramm können vielfältiger Natur sein (14) und sind

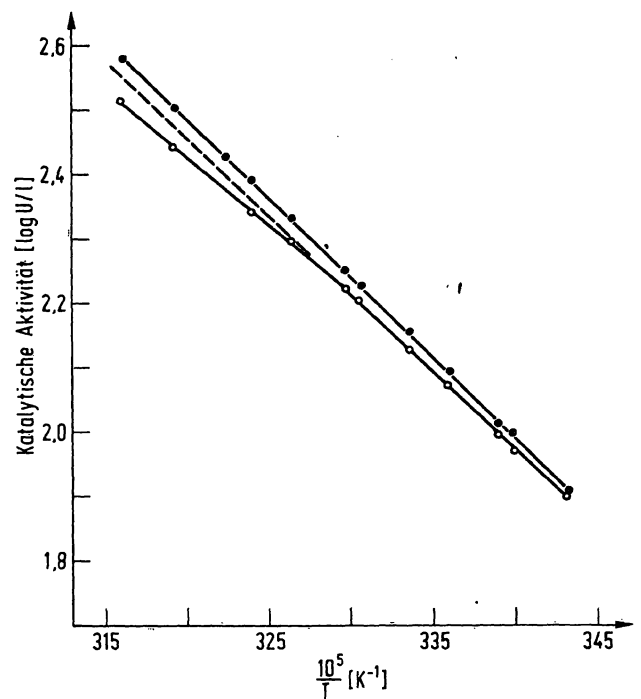


Abb. 1. Arrhenius-Auftragung für die Aspartataminotransferase-Aktivität eines gepoolten Serums mit und ohne Pyridoxal-5'-phosphat-Zusatz.

Meßbedingungen: s. Methodik. Standardabweichung  $s$  in der Serie  $\pm 2,9$  U/l für Aktivitätsbestimmungen ohne Pyridoxal-5'-phosphat bzw.  $\pm 3,0$  U/l mit Pyridoxal-5'-phosphat

○ — ohne Pyridoxal-5'-phosphat  
● — mit Pyridoxal-5'-phosphat

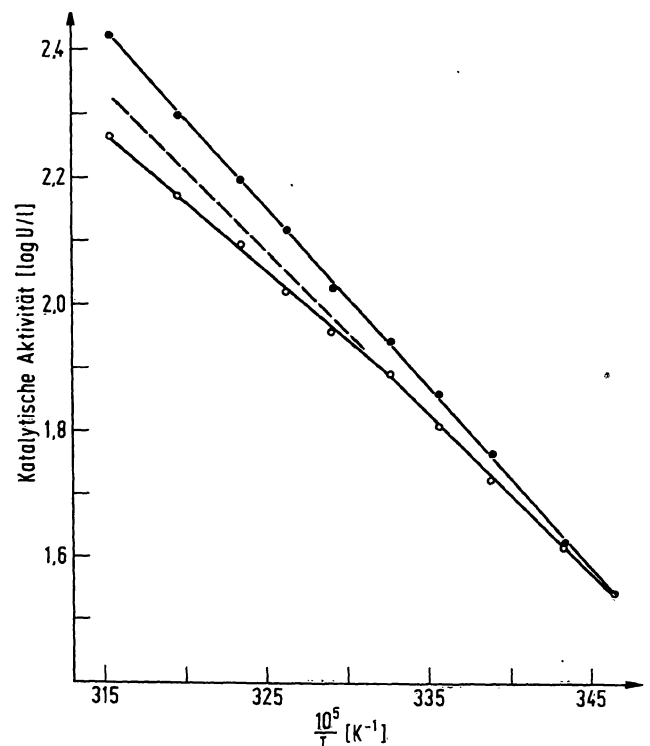


Abb. 2. Arrhenius-Auftragung für die c-Aspartataminotransferase-Aktivität mit und ohne Pyridoxal-5'-phosphat-Zusatz.

Meßbedingungen: s. Methodik. Standardabweichung  $s$  in der Serie  $\pm 2,3$  U/l für Aktivitätsbestimmungen ohne Pyridoxal-5'-phosphat bzw.  $\pm 1,7$  U/l mit Pyridoxal-5'-phosphat.

Symbole wie in Abb. 1

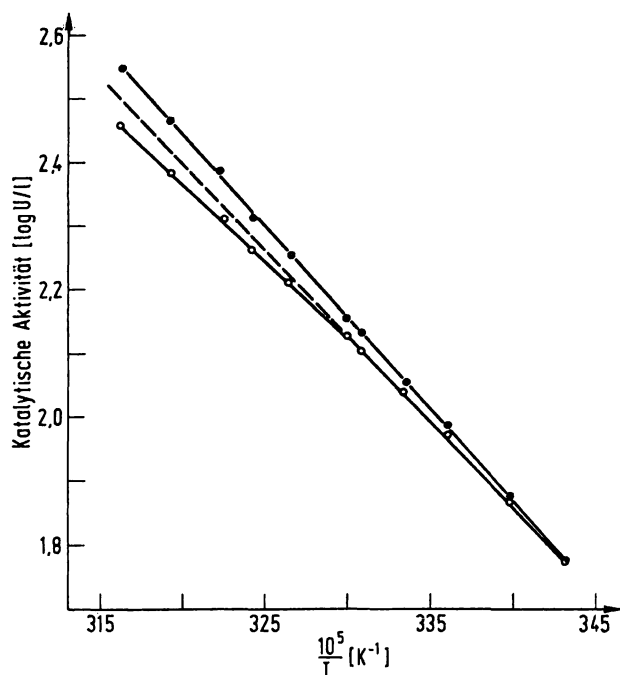


Abb. 3. Arrhenius-Auftragung für die m-Aspartataminotransferase-Aktivität mit und ohne Pyridoxal-5'-phosphat-Zusatz.

Meßbedingungen: s. Methodik. Phosphatpuffer-Konzentration jedoch 107 mmol/l. Standardabweichung  $s$  in der Serie  $\pm 2,5$  U/l für Aktivitätsbestimmungen ohne Pyridoxal-5'-phosphat bzw.  $\pm 1,9$  U/l mit Pyridoxal-5'-phosphat. Symbole wie in Abb. 1

nicht immer Beweis für eine thermische Denaturierung des Enzyms. Veränderungen in der Proteinstruktur bzw. in den optimalen Testbedingungen in Abhängigkeit von

der Temperatur werden von Szasz (3) angeführt. Die Abweichungen von der Linearität sind durch letztere bei der Aspartataminotransferase nicht zu erklären, da für den untersuchten Temperaturbereich die Testbedingungen als hinreichend optimal angesehen werden können (4). Bei Meßtemperaturen über  $30^\circ\text{C}$  wird die m-Aspartataminotransferase durch die im Testsystem verwendete L-Aspartat-Konzentration von 200 mmol/l geringfügig gehemmt (4). Aber auch nach Reduzierung des L-Aspartats auf 100 mmol/l blieb die Diskontinuität im Arrhenius-Diagramm bestehen. Unsere Untersuchungen weisen hierbei auf die besondere Rolle des Pyridoxal-5'-phosphats, des Coenzym der Aspartataminotransferase hin.

Die in Abhängigkeit von der Meßtemperatur unterschiedliche Stimulierungsrate der Aspartataminotransferase-Aktivität durch Pyridoxal-5'-phosphat, dargestellt an Patientenserien und den Isoenzymen, spricht für eine möglicherweise verringerte Affinität des Coenzym zum Apoenzym. Die Beseitigung der Diskontinuität im Arrhenius-Diagramm durch das Pyridoxal-5'-phosphat ist Ausdruck der wechselseitigen Beziehungen zwischen Coenzym, Apoenzym und gemessener Aktivität der Aspartataminotransferase. Wir sehen diese Befunde als Bestätigung unserer schon in einer vorhergehenden Publikation (5) nachgewiesenen Notwendigkeit an, die Frage der Temperatur bei Enzymaktivitätsbestimmungen im komplexen Zusammenhang mit den anderen Reaktionsbedingungen zu betrachten. Es zeigt sich, daß für bestimmte Enzyme das Coenzym gleichfalls zu berücksichtigen ist.

## Literatur

1. Bergmeyer, H. U. (1973), diese Z. 11, 39–45.
2. Bowers, G. N. (1972), 8. Internationaler Kongreß Klinische Chemie, Kopenhagen.
3. Szasz, G. (1974), diese Z. 12, 166–170.
4. Lüttke, B., Jung, K. & Egger, E., Zbl. Pharm., im Druck.
5. Jung, K., Egger, E., Neumann, R. & Lüttke, B. (1974), diese Z. 12, 159–165.
6. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft Klinische Chemie (1972), diese Z. 10, 182–192.
7. Laudahn, G. & Hartmann, E. (1970), Klin. Wochenschr. 48, 1010–1012.
8. Nisselbaum, J. S. (1968), Anal. Biochem. 23, 173–181.
9. Schmidt, E., Schmidt, F. W. & Herfarth, Ch. (1962), Klin. Wochenschr. 40, 1133–1136.
10. Jenkins, W. T., Yphantis, D. A. & Sizer, I. W. (1958), J. Biol. Chem. 234, 51–57.
11. O'Kane, D. E. & Gunsahns, I. C. (1947), J. Biol. Chem. 170, 425–432.
12. Rej, R., Fasce, C. F. & Vanderlinde, R. E. (1973), Clin. Chem. 92–98.
13. Dempsey, W. B. & Christensen, H. N. (1962), J. Biol. Chem. 237, 1113–1120.
14. Dixon, M. & Webb, E. C. (1964), Enzymes, Longman & Co., London, S. 158ff.

Dr. K. Jung, Brigitte Lüttke, Prof. Dr. E. Egger,  
Abteilung Klinische Biochemie  
des Bereichs Medizin (Charité)  
und Lehrstuhl  
für Pathologische Biochemie  
der Humboldt-Universität Berlin,  
104 Berlin, Schumannstraße 20/21.

